



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA  
FACULTAD DE ECONOMIA  
SECRETARIA ACADEMICA  
"AÑO INTERNACIONAL DE LA QUINUA"

Piura, 03 de enero del 2013.

**OFICIO N° 004- 2013-FE-SA**

Señor Econ.

Dr. CARLOS GRANDA WONG.

Director del Instituto de Investigación. UNP

Presente.-

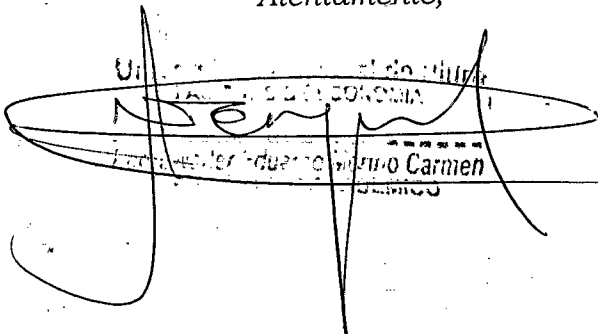
**ASUNTO: ENVIO DE TESIS.**

Me dirijo a usted para saludarle cordialmente y a la vez alcanzar a su despacho 01 ejemplar de las Tesis, que se indica:

**BR. SOTO CORDOVA - JORGE JEAN PIERRE** Tesis "ANÁLISIS DEL CAPITAL HUMANO Y LA POBREZA DEPARTAMENTAL EN EL PERU EN EL PERIODO 2004- 2009".

Sin otro particular, me despido de usted.

Atentamente,



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA  
FACULTAD DE ECONOMIA  
SECRETARIA ACADEMICA  
Carmen

c.c.:

Archivo.

WEMC/FJC



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**Identificación Inmunológica (ELISA) de *Entamoeba histolytica* en muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. Noviembre 2013-Abril 2014.**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**BIÓLOGO**

**Br. Sarah Lindsay Mendoza Mendoza**

**PIURA-PERU**

**2014**

**Br. Sarah Lindsay Mendoza Mendoza**

**Ejecutor**

**Blgo-Mcblgo. César Torres Díaz M.Sc**

**Asesor de Tesis**

**Blgo-Mcblgo. Jaime Fernández Ponce**

**Presidente de jurado**

**Mcblgo. Jorge Luis Bermejo Benites**

**Secretario**

**Blga. Claudia del Pilar Ruiz González M. Sc**

**Vocal**

**DEDICATORIA:**

*A quienes tienen un sueño y conocen a lo que  
tienen que renunciar con el propósito de avanzar.*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Señor, que guía nuestros pasos y día a día nos da una oportunidad de hacer cosas nuevas para ser mejores personas y profesionales.*

*A mi madre y a mi abuela, quienes arriesgaron todo por permitirme tener la mejor herencia de todas: una profesión.*

*A mi asesor y amigo César Torres Díaz por la paciencia y apoyo profesional en cada paso de la realización de la tesis.*

*A mis jurados de tesis: Jaime Fernández Ponce, Jorge Bermejo Benites y Claudia Ruiz González, más que jurados, tres asesores durante el desarrollo de la tesis.*

*A mis amigos: Jennifer Seminario Guerrero, Carlos Rivas Quintana, Juan Ogoña Jiménez, Rosa Cruz Ojeda y Sandra Cruz Guerrero por su constante apoyo.*

*A la Dra. Muchin Ruiz Leud por brindarme las facilidades dentro del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. Así como a las personas que laboran dentro del laboratorio, pues más que un grupo de trabajo somos una familia.*

## ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS. ....	i
ÍNDICE DE FIGURAS. ....	ii
RESUMEN. ....	iv
ABSTRACT. ....	v
I. INTRODUCCIÓN. ....	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS. ....	7
2.1. POBLACIÓN EN ESTUDIO. ....	7
2.2. OTENCIÓN DE MUESTRAS. ....	8
2.3. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA). ....	8
2.3.1. Preparación y conservación de las muestras. ....	8
2.3.2. Preparación del buffer de lavado. ....	8
2.3.3. Primera incubación. ....	9
2.3.4. Lavado. ....	9
2.3.5. Segunda incubación. ....	9
2.3.6 Lectura. ....	9
2.3.6.1. Cálculo del cut-off o punto de corte. ....	10
2.3.6.2. Interpretación de los resultados obtenidos. ....	10
III. RESULTADOS. ....	11
3.1. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA). ....	11
IV. DISCUSIÓN. ....	14
V. CONCLUSIONES. ....	18
VI. RECOMENDACIONES. ....	19
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	20
ANEXOS. ....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	Pág.
Tabla 1. Características macroscópicas de las muestras fecales positivas y negativas a <i>Entamoeba histolytica</i> por la técnica de ELISA procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	12
Tabla 2. Datos personales y diagnóstico coproparasitológico de los pacientes procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	26
Tabla 3. Características macroscópicas de las muestras fecales positivas y negativas a <i>Entamoeba histolytica</i> por examen directo, procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	27
Tabla 4. Especies parasitarias identificadas por examen directo en las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	28
Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en la primera corrida de las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.....	29
Tabla 6. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en la segunda corrida de las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	30
Tabla 7. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en la tercera corrida de las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	31
Tabla 8. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en la cuarta corrida de las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	Pág.
Fig. 1. Ubicación del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	7
Fig.2.Porcentaje de muestras positivas a <i>Entamoeba histolytica</i> por la técnica de ELISA en las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	11
Fig.3.Porcentaje de los síntomas presentes en los niños infectados con <i>Entamoeba histolytica</i> , provenientes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	13
Fig.4. Reactivos y materiales utilizados para la identificación de <i>Entamoeba histolytica</i> por la técnica de ELISA. ....	33
Fig.5. Equipo semiautomatizado de ELISA marca Tecam: A la izquierda, el lavador de placas y a la derecha el fotómetro lector de microplacas. ....	33
Fig. 6. Conservación de las muestras a -20°C. ....	34
Fig. 7. Preparación del buffer de lavado. ....	34
Fig. 8. Primera incubación de las muestras. ....	35
Fig. 9. Lavado de las muestras. ....	35
Fig. 10. Segunda incubación de las muestras en la oscuridad. ....	36
Fig. 11. Evaluación fotométrica a 450 nm. ....	36
Fig. 12. Muestras positivas a <i>Entamoeba histolytica</i> por la técnica de ELISA. ....	37



Fig. 13. Quiste de <i>Entamoeba histolytica</i> . Montaje en fresco 100x. ....	37
Fig.14. Porcentaje de muestras positivas a <i>Entamoeba histolytica</i> asociados a otros protozoarios y helmintos intestinales en las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	38
Fig.15.Porcentaje de los síntomas presentes en los niños infectados con enteroparásitos, provenientes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	39
Fig.16. Resultados de microscopía y ELISA en muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. ....	40

## RESUMEN

Se realizó la identificación de *Entamoeba histolytica* evaluándose 80 muestras fecales procedentes del Anexo Pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura, utilizando la microscopía convencional y la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA). Se obtuvo el 12,5% y 15% de muestras positivas respectivamente. Ambas pruebas fueron positivas en 7 (8,75%) muestras, 3 (3,75%) por microscopía, y 5 (6,25%) por ELISA. La diferencia en cuanto a los porcentajes obtenidos aplicando estas técnicas, refleja que la observación de *Entamoeba histolytica* no es frecuente y que existe una sobreestimación del parásito en la población en estudio. El empleo del Inmunoensayo enzimático (ELISA) para la identificación de antígenos de *Entamoeba histolytica* debe ser empleado como prueba de rutina en los diferentes centros asistenciales debido a la similitud morfológica con otras especies amébicas en particular con *Entamoeba dispar*, de esta manera, se garantizarían resultados confiables y la emisión de tratamientos adecuados a la infección existente.

**Palabras clave:** *Entamoeba histolytica*, antígeno, ELISA, Microscopía.

## ABSTRACT

The identification of *Entamoeba histolytica* was realized there being evaluated 80 fecal samples proceeding from Anexo Pediátrico del Hospital de Apyo II Santa Rosa-Piura, using the conventional microscopy and the test of inmunoensayo enzimático (ELISA). Obtained 12,5 % and 15 % of positive samples respectively. Both tests were positive to 7 (8,75 %) samples, 3 (3,75 %) for microscopy, and 5 (6,25 %) for ELISA. The difference obtained in the percentages by applying these techniques, reflects the observation of *Entamoeba histolytica* is not frequent and there is an overestimation of the parasite exists in the population under study. The use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the identification of antigens of *Entamoeba histolytica* should be used as a routine test on the different assistance centers due to the fact of the morphological similarity with other amebic species in particular with *Entamoeba dispar*. In this way, it would guarantee to obtend reliable results and the issuance of appropriate treatments to the existing infection.

**Key words:** *Entamoeba histolytica*, Antigen, ELISA, microscopy.

## I. INTRODUCCIÓN

La amebiasis fue reconocida por primera vez, como una enfermedad mortal por Hipócrates (377-460 AC) quien describió pacientes con fiebre y disentería. Más tarde, el antiguo testamento de Huang Ti (140- 87 AC), un clásico de medicina interna, hace también referencia a la disentería<sup>1</sup>. Sin embargo, los hitos en el estudio de *Entamoeba histolytica* fueron los realizados por Losh, en 1875, describiendo por primera vez en detalle la amibiasis intestinal ocasionada por *Entamoeba histolytica*. Posteriormente, Brumpt en 1925 formula la teoría sobre la diferencia entre las infecciones amibianas asintomáticas y la enfermedad amibiana, donde podría estar relacionada con la existencia de dos especies distintas, pero morfológicamente idénticas: *Entamoeba histolytica*, capaz de causar la enfermedad invasiva, y *Entamoeba dispar*, que nunca causa enfermedad. Esta teoría fue descartada por un tiempo, hasta que las evidencias que apoyaban la hipótesis de Brumpt comenzaron a acumularse. En 1993, 68 años después del descubrimiento original de *Entamoeba dispar*, se aceptó formalmente que *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* son especies diferentes, estrechamente relacionadas, con base en análisis genéticos, inmunológicos y bioquímicos<sup>2,3</sup>.

*Entamoeba histolytica* pertenece al phylum Sarcomastigophora, subphylum sarcodina, superclase Rhizopoda, clase Lobosea, orden Amoebida, familia Entamoebidae, género *Entamoeba*, especie *Entamoeba histolytica*, Shaudinn, 1903<sup>4,5</sup>. Es el agente causal de la amebiasis intestinal y es considerada mundialmente como uno de los parásitos principales que causa mortalidad en humanos<sup>6</sup>. Presenta un ciclo biológico sencillo que, en ciertas circunstancias, puede desencadenar la patogénesis de amibiasis invasiva de la mucosa intestinal adhiriéndose e invadiendo las células epiteliales intestinales; además, puede migrar hacia otros órganos ocasionando amibiasis extraintestinal, por diferentes mecanismos patogénicos, como formación de poros en la membrana, producción de proteasas y eritrofagocitosis, entre otras<sup>7</sup>. Los trofozoítos miden 12 a 60 µm de diámetro, poseen un solo núcleo que tiene forma esférica con una membrana bordeada de pequeños gránulos de cromatina y un pequeño cariosoma central. Emiten pseudópodos con movimientos unidireccionales. El citoplasma puede mostrar vacuolas con inclusiones y hemáties, característica que lo diferencian de otras amibas. Los quistes son esféricos y miden de 10 a 20 µm de diámetro, contienen 1 a 4 núcleos dependiendo de su madurez<sup>8,9</sup>.

Una fuente de infección relevante la constituyen aquellos casos de portadores asintomáticos a la enfermedad que en ciertos períodos presentan algún síntoma diarreico y eliminan quistes los cuales son de gran importancia epidemiológica porque se comportan como diseminadores de la infección. La transmisión de la enfermedad es facilitada por diversos factores como la mala higiene personal, la falta de agua potable e inadecuada manipulación de alimentos. Esta infección afecta, en su mayoría, las poblaciones de bajos recursos económicos y de extrema pobreza<sup>10</sup>. La mala disposición de excretas y basura, el hacinamiento y las relaciones homosexuales promiscuas también son importantes mecanismos de transmisión, así como los vectores mecánicos, tales como moscas y cucarachas, entre otros<sup>11</sup>. Esta enfermedad ataca al ser humano en cualquier edad, siendo más frecuente en niños mayores de 3 años y adultos jóvenes, donde el saneamiento es deficiente<sup>12</sup>.

Con respecto a la epidemiología de las infecciones humanas por *Entamoeba histolytica* se conoce que, en países en desarrollo, esta infección es común en niños, y en países endémicos está asociada a diarreas o disenterías. Sin embargo, las características clínicas de la amibiasis por *Entamoeba histolytica* se extienden desde colonización asintomática hasta disentería amibiana y amibiasis extraintestinal invasiva, manifestándose esta última, comúnmente, bajo la forma de abscesos en el hígado<sup>13</sup>. Al respecto, se reporta que aproximadamente entre 34 y 50 millones de personas tienen la enfermedad invasiva, originando de 34 mil y cien mil muertes por año<sup>14</sup>. Aunque este parásito tiene distribución mundial, las prevalencias superiores al 10 % han sido reportadas en varios países en desarrollo<sup>15</sup>. A pesar de la disponibilidad de terapias efectivas contra *Entamoeba histolytica*, la morbilidad y mortalidad de la infección ha persistido, sugiriendo esto que las medidas para eliminar o limitar la enfermedad son ineficaces y, como al parecer el humano es el único hospedador, un programa de control apropiado debería erradicar la infección<sup>16</sup>.

El diagnóstico de la infección por *Entamoeba histolytica* ha dependido del estudio de los síntomas clínicos del paciente así como del examen microscópico de muestras fecales seriadas, en el cual se observa el tamaño de los trofozoítos (12-60  $\mu\text{m}$  de diámetro) y quistes (10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro) característicos del parásito en las muestras de heces, número de núcleos en el quiste maduro, estructura nuclear, entre otros<sup>1</sup>.

A pesar de que el examen directo es rápido y sencillo, tiene una sensibilidad limitada y requiere de un observador experimentado que interprete acertadamente la diferencia limitada entre la especie patógena y las no patógenas representando esto grave causa de errores para el diagnóstico de esta infección. Se señala que el examen directo no es suficiente para el diagnóstico de *Entamoeba histolytica* por lo que, debe complementarse con técnicas de tinción como la coloración permanente tricrómica, que se recomienda como técnica auxiliar al método directo, ya que permite una mejor visualización de los elementos intracelulares de esta especie<sup>1</sup>. Sin embargo, la coloración tricrómica y la hematoxilina férrica son técnicas insensibles para la detección de *Entamoeba histolytica*, además de no permitir diferenciar entre esta especie patógena de las no patógenas que son morfológicamente idénticas<sup>17</sup>.

Por ello, desde 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reglamentó reportar el complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, en presencia de quistes y trofozoítos no hematófagos; además, recomendó identificar y diferenciar la especie patógena *Entamoeba histolytica* de las otras especies no patógenas del género, debido a que estas últimas no requieren tratamiento<sup>14</sup>. No obstante, la aplicación de tratamientos erróneos está motivado en parte a que el diagnóstico de infecciones intestinales por *Entamoeba histolytica* se basan principalmente en el estudio microscópico de la materia fecal, metodología que tiene una sensibilidad del 60 % cuando se realiza bajo condiciones óptimas<sup>18</sup>. Además de la desventaja de este tipo de diagnóstico para diferenciar las especies de *Entamoeba*, debido a que los quistes y trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* son idénticos<sup>19</sup> excepto en los casos de enfermedad invasiva por *Entamoeba histolytica*, donde se observan los trofozoítos de la amiba con glóbulos rojos ingeridos<sup>20</sup>.

Los cultivos de las heces seguido de un análisis de isoenzimas permiten diferenciar entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*, pero se requiere de una o varias semanas para obtener resultados e instalaciones especiales en los laboratorios, lo que es inusual para ser empleado como rutina en el diagnóstico de la amibiasis intestinal<sup>19</sup>. Evidencias bioquímicas, inmunológicas y genéticas han establecido la diferenciación específica entre *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii* y han permitido la detección de las tres especies en el ser humano<sup>21,22,23,24,25,26</sup>. Aceptando que sólo

*Entamoeba histolytica* puede causar invasión intestinal y enfermedad extracelular<sup>15</sup> debido a su capacidad patógena, determinada por un conjunto de factores de virulencia propios del parásito<sup>27</sup>. Existen métodos inmunológicos que pueden detectar tanto antígenos en heces como anticuerpos en suero y para ambos casos la técnica más utilizada es ELISA<sup>24</sup>.

La detección de antígenos en heces es una prueba que usa anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar a *Entamoeba histolytica*. Esta prueba es rápida, altamente sensible y ampliamente usada en el diagnóstico de laboratorio. La prueba de antígenos se usa para confirmar los hallazgos de microscopía (falsos negativos). Estas pruebas también son de ayuda para interpretar resultados positivos en la serología amibiana en pacientes de países endémicos, debido a que los resultados positivos en una prueba de antígenos indican más una infección actual que una infección anterior<sup>28</sup>.

El método usa placas sensibilizadas con un anticuerpo policlonal anti-*E. histolytica* que atrapa los antígenos de la amiba presente en las heces. En una segunda fase, se utiliza un anticuerpo monoclonal anti-*E. histolytica* con especificidad para un antígeno exclusivo de este protozooario, el cual se encuentra marcado con una enzima. En la fase final, se adiciona el sustrato correspondiente que, en casos positivos, al encontrarse con el anticuerpo monoclonal forma una solución colorida. La intensidad del color, dependiente de la cantidad de antígeno amibiano, se evalúa por espectrofotometría<sup>29</sup>.

En 1992 se reportó el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático para la detección en heces de histolisaina, proteasa excretada por *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*<sup>30</sup>. Este procedimiento, denominado ENZYMEBA, tiene la particularidad de que el propio parásito aporta la enzima que detecta su presencia. A diferencia de los sistemas inmunoenzimáticos (ELISA) clásicos, no se requiere de un segundo anticuerpo conjugado a una enzima reveladora. ENZYMEBA, aunque permite demostrar la infección amibiana con el examen de una sola muestra por paciente, no distingue entre infecciones por *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*, por lo cual su mayor utilidad sería en la discriminación de la presencia del complejo *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* del resto de las amibas<sup>19</sup>.

En relación a la detección de antígenos de estas amibas, pueden ser utilizados anticuerpos monoclonales (MAb) dirigidos contra la lectina de adherencia, inhibible por galactosa y N-acetilgalactosamina, para distinguir entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*<sup>31</sup>. Los anticuerpos monoclonales dirigidos a epitopes 1 y 2 se unen a lectinas de ambas especies (estos detectan la presencia de cualquiera de las dos o ambas), este kit se denomina Entamoeba Test; mientras anticuerpos monoclonales contra los epitopes del 3 al 6 reconocen solo la lectina de *Entamoeba histolytica*. Usando anticuerpos antilectina policlonales para capturar la lectina, es posible detectar específicamente a *Entamoeba histolytica* en las heces de pacientes con disentería amibiana. Este es el fundamento de la técnica inmunoenzimática disponible comercialmente con el nombre de *E. histolytica* II Test. Este procedimiento permite identificar específicamente a *Entamoeba histolytica*, pero no reconoce a *Entamoeba dispar*<sup>19</sup>.

*E. histolytica* TechLab kit fue diseñada en 1993 para detectar específicamente *Entamoeba histolytica* en las heces. Esta prueba de detección de antígeno captura y detecta la subunidad ligera de la lectina específica de la galactosa (Gal/GalNAc) del parásito en muestras de heces. Debido a las diferencias antigénicas de las lectinas de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*, la prueba permite la identificación específica de la *Entamoeba histolytica* causantes de enfermedades. El nivel de detección de antígenos amebianos es bastante alto, pues requiere aproximadamente mil trofozoitos por pozo<sup>32</sup>. Sin embargo, esta prueba sufre la desventaja de que los antígenos detectados son desnaturalizados por la fijación de la muestra de heces; por lo tanto, limitan las pruebas a muestras frescas o congeladas. Asimismo, esta prueba ha demostrado buena sensibilidad y especificidad para la detección de antígeno de *Entamoeba histolytica* en muestras fecales de personas que sufren de colitis amébrica y la infección intestinal asintomática<sup>33</sup>. Por otro lado TechLab *E. histolytica* kit II presenta una sensibilidad de 86% a 95% y una especificidad de 93% a 100% en comparación con la microscopía (preparación microscópica en fresco con solución salina al 0.9% y de Lugol) y el cultivo para la identificación de *Entamoeba histolytica* como un método de cribado en zonas de Bangladesh (al Sur de Asia) con alta endemicidad<sup>13</sup>.

El empleo de antígenos recombinantes como es el caso de la subunidad de 170 kDa o del antígeno denominado proteína de *Entamoeba histolytica* rica en residuos de serina,



ofrecen una serie de ventajas: pueden ser producidos en grandes cantidades con relativa facilidad, se evita la necesidad de mantener cultivos de *E.histolytica* y además el uso de un antígeno recombinante puede ayudar al desarrollo de un ensayo bien estandarizado. Otro posible beneficio es la aparente capacidad que tiene ELISA, basados en este tipo de antígenos, para diferenciar un cuadro agudo de uno crónico<sup>34</sup>. Esto sería muy útil principalmente en zonas altamente endémicas en donde el número de individuos seropositivos por infección anterior es muy elevado<sup>17</sup>.

El objetivo de esta investigación fue utilizar la técnica de ELISA para la determinación de *Entamoeba histolytica* en muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. POBLACIÓN EN ESTUDIO

Se analizaron muestras fecales de 80 niños, entre 1 mes y 10 años de edad, y de ambos sexos, con infección diarreica aguda no mayor de 7 días de evolución; procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa, Piura-Perú (Fig. 1) durante el periodo comprendido entre noviembre del 2013 hasta abril del 2014.

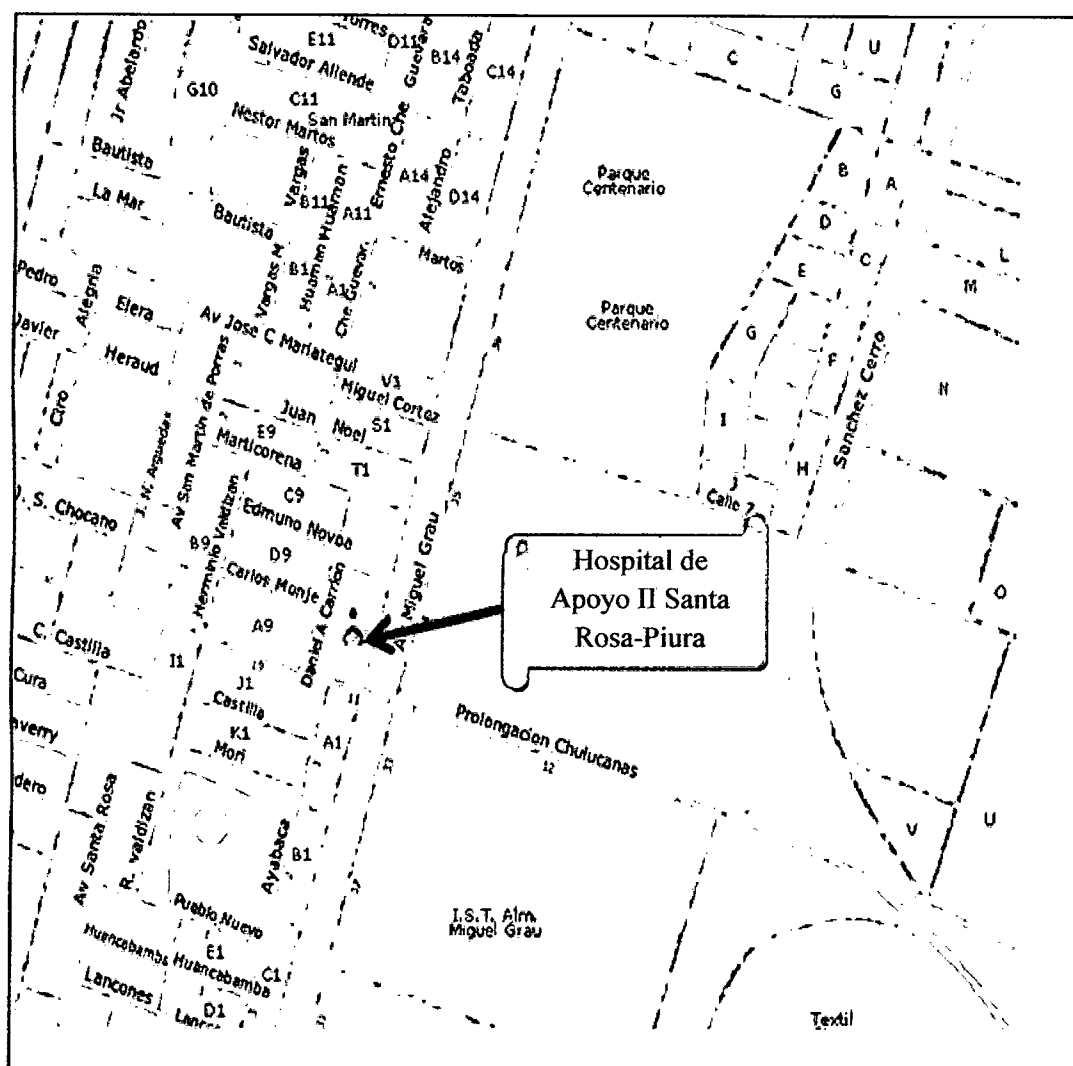


Fig. 1. Ubicación del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

## **2.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las muestras fecales se tomaron mediante la técnica del pañal invertido o mediante la estimulación rectal con un hisopo, y se depositaron en un frasco de boca ancha. Estas muestras fueron debidamente rotuladas y llevadas al laboratorio, para su procesamiento a través del inmunoensayo enzimático (ELISA). Adicionalmente se obtuvo la información relacionada con cada una de las muestras a evaluar, como características físicas de la muestra, tales como, aspecto, consistencia, color, olor, presencia o ausencia de moco, sangre y vermes adultos. Por otro lado, se recopilaron los datos referentes a los signos y síntomas de los niños al momento de la recolección de la muestra (fiebre, diarrea, dolor abdominal, entre otros) y se anotó el reporte de todos los helmintos y protozoarios intestinales identificados microscópicamente en cada una de las muestras (Ver Anexos, Tabla 2).

## **2.3. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)**

Se realizaron cuatro muestreos de 20, 20, 23 y 17 muestras cada uno (Ver Anexos, Tablas 5, 6, 7 y 8), utilizando el test RIDASCREEN®- Entamoeba y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante como se detalla a continuación:

### **2.3.1. Preparación y conservación de las muestras**

En un tubo de ensayo rotulado se agregó 1 ml de buffer de dilución de muestras de RIDASCREEN® Diluent | 1 con 100 µl de las heces líquidas, luego se homogenizó la muestra y se cubrió con parafina. Finalmente se guardó el material a -20°C hasta su procesamiento (Ver Anexos, Fig. 6).

### **2.3.2. Preparación del buffer de lavado**

Se mezcló 20 ml del buffer de lavado concentrado Wash con 380 ml de agua destilada (dilución 1:20). Los cristales que se formaron en el buffer concentrado se solubilizaron con calor (baño María a 37°C) (Ver Anexos, Fig. 7).

### **2.3.3. Primera Incubación**

Una vez centrifugadas las muestras a 5000 rpm (aprox. 2000-2500 G) durante 5 minutos, se colocaron los pocillos en el marco de soporte de la prueba según la cantidad de muestras a procesar. A cada pocillo se le agregó 100 µl de la muestra; 100 µl del control positivo y 100 µl del control negativo. A continuación se adicionó 100 µl del anticuerpo conjugado con peroxidasa contra *Entamoeba histolytica* en solución de proteína estabilizada, se homogenizó y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C) (Ver Anexos, Fig. 8).

### **2.3.4. Lavado**

Se lavó 5 veces con 300 µl de buffer de lavado en cada caso, utilizando el equipo lavador de ELISA. Después del último paso de lavado se sacudió la placa sobre papel absorbente limpio para eliminar la humedad residual (Ver Anexos, Fig. 9).

### **2.3.5. Segunda Incubación**

Se añadieron 100 µl de sustrato (Peróxido de úrea/TMB) a cada uno de los pocillos. Se incubó la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 °C) en la oscuridad (Ver Anexos, Figura 11). Luego se adicionaron 50 µl de reactivo de parada en cada uno de los pocillos para detener la reacción. Se mezclaron cuidadosamente (con ligeros golpes en los bordes de la placa) y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando el equipo de ELISA marca Tecam (Ver Anexos, Fig. 10).

### **2.3.6. Lectura**

Tanto los controles positivos como los controles negativos se procesaron cada vez que se realizó el inmunoensayo, para verificar la estabilidad de los reactivos y el correcto desarrollo del procedimiento. La corrida se consideró correcta para el control negativo y positivo si el valor de absorbancia (O.D.) a 450 nm era menor a 0,2 y mayor a 0,8 respectivamente.

### **2.3.6.1. Cálculo del Cut-off o punto de corte**

El cut-off se determinó al adicionar 0.15 unidades de absorbancia al valor obtenido del control negativo, tal como lo indica el inserto del fabricante.

$$\text{Cut-off} = \left( \frac{\text{O.D del Control Negativo 01} + \text{O.D del control Negativo 02}}{2} \right) + 0.15$$

### **2.3.6.2. Interpretación de los resultados obtenidos**

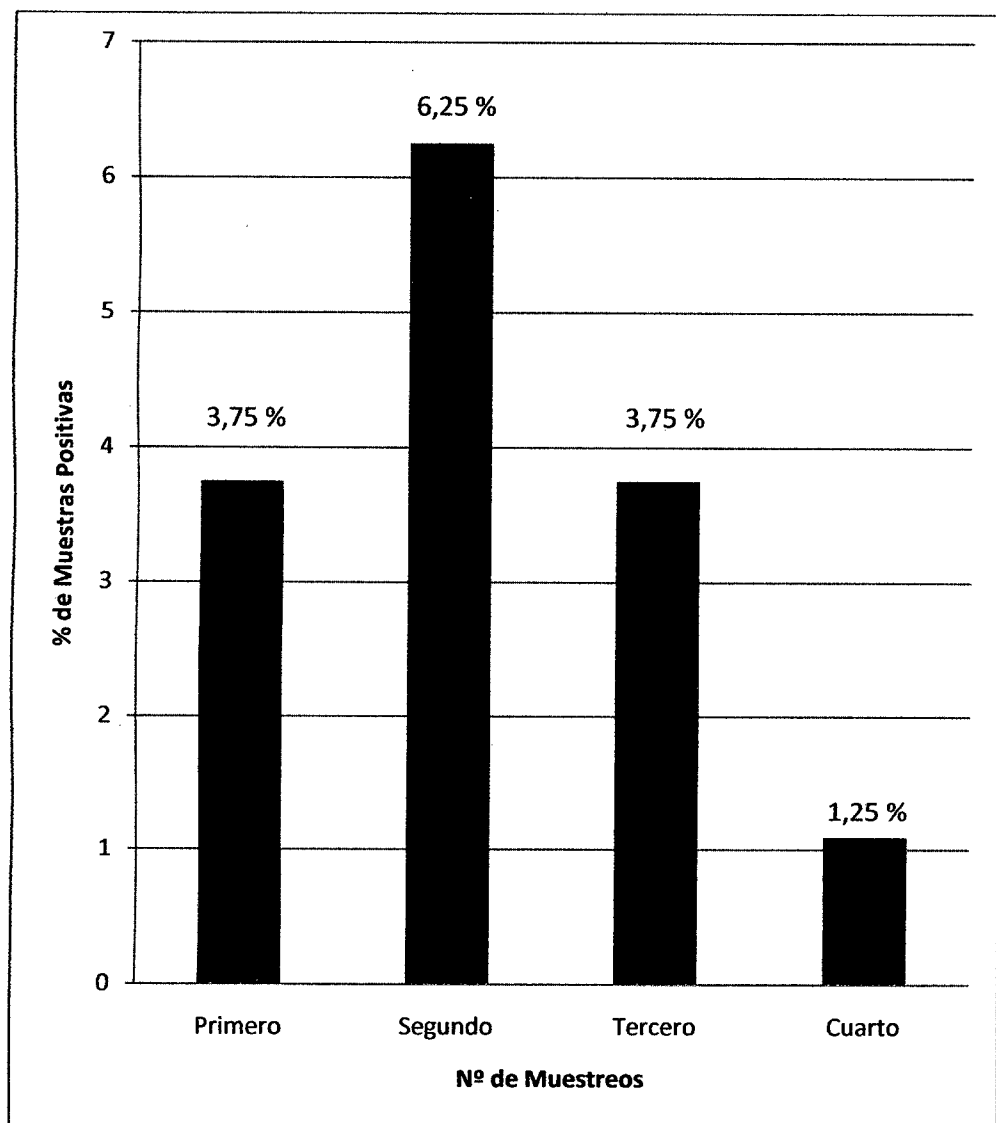
Las muestras se consideraron positivas si los valores de absorbancia eran mayores al cut-off calculado; las muestras negativas fueron aquellas que tenían valores de absorbancia menores al valor del cut-off calculado.

Aquellas muestras que tuvieron valores de absorbancia dentro del rango correspondiente a un 10% mayor o menor al valor del cut-off calculado, no se consideraron claramente como positivas o como negativas sino más bien como indeterminadas.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)

Independientemente del resultado coproparasitológico (examen directo), todas las 80 muestras fecales evaluadas, fueron procesadas por la técnica de ELISA; sólo el 15% (12/80) de las muestras resultaron positivas a *Entamoeba histolytica*, distribuidas de la siguiente manera: 3,75% (3/80) en el primer muestreo; 6,25% (5/80) en el segundo; 3,75% (3/80) en el tercero y 1,25% (1/80) en el cuarto y último muestreo (Fig. 2).



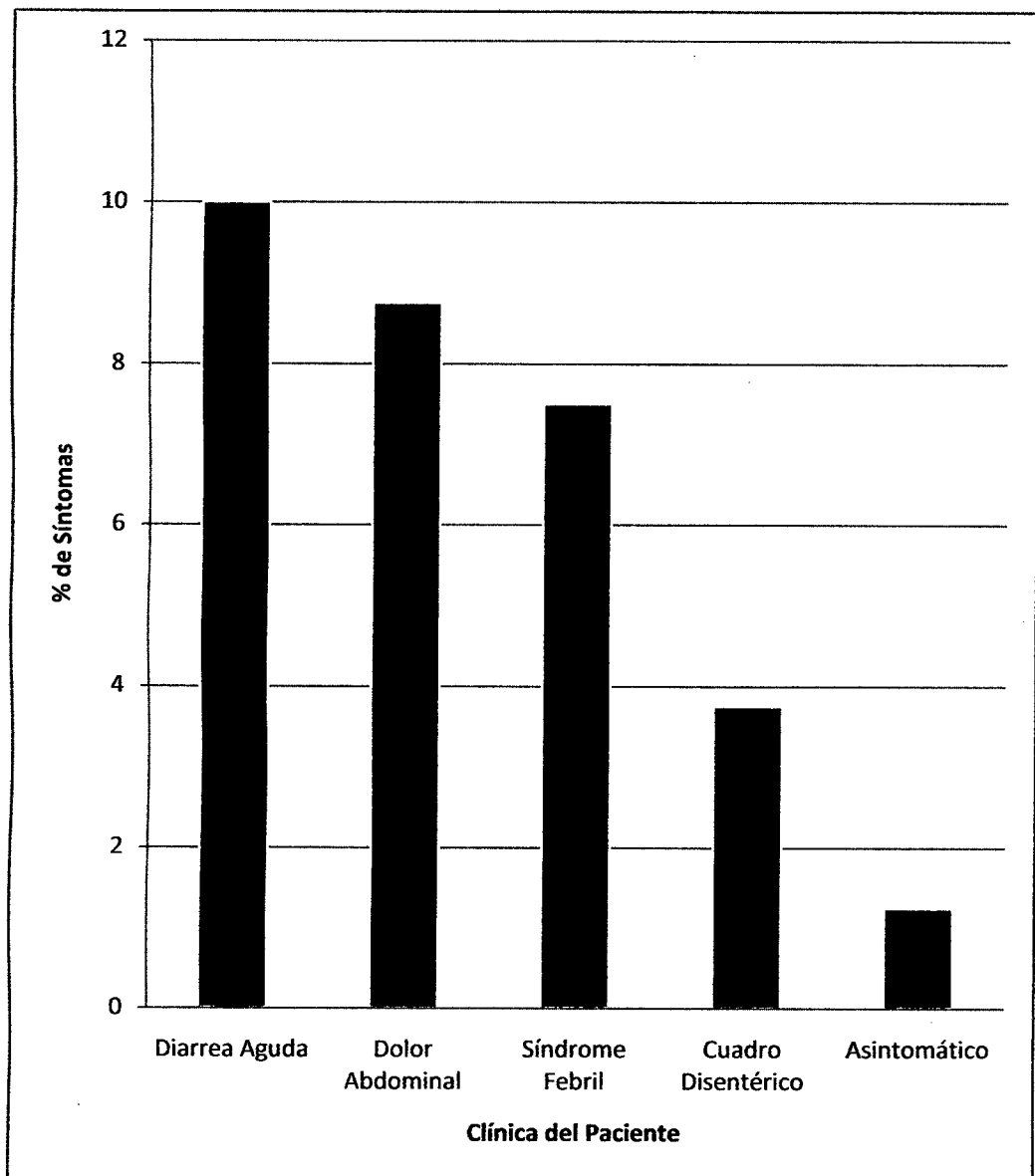
**Fig.2.** Porcentaje de muestras positivas a *Entamoeba histolytica* por la técnica de ELISA en las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

Con respecto a las características macroscópicas, se observó que las muestras fecales positivas a *Entamoeba histolytica* por la técnica de ELISA fueron de consistencia: diarreica líquida (8), diarreica (2), acuosa (1) y semilíquida (1). Asimismo, el 7,5% (6/80) de las muestras tenía sangre y moco; el 6,25% (5/80) tenía moco y el 1,25% (1/80) no tenía ninguna de las dos características (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características macroscópicas de las muestras fecales positivas y negativas a *Entamoeba histolytica* por la técnica de ELISA procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

Características de las Muestras Fecales		Técnica de Elisa			
		Muestras Positivas		Muestras Negativas	
		Nº	%	Nº	%
Consistencia	Diarreica Líquida	8	10	29	36,25
	Diarreica	2	2,5	31	38,75
	Acuosa	1	1,25	0	0
	Líquida	0	0	6	7,5
	Semilíquida	1	1,25	2	2,5
Presencia	Moco	5	6,25	34	42,5
	Sangre	0	0	0	0
	Sangre y Moco	6	7,5	3	3,75
Ausencia de sangre y moco		1	1,25	31	38,75

La diarrea aguda fue el síntoma más común de estas infecciones por *Entamoeba histolytica* 10% (8/80) acompañadas de síndrome febril 8,75% (7/80) y dolor abdominal 7,5% (6/80), seguido de cuadro disentérico 3,75% (3/80). Sólo el 1,25% (1/80) de los niños evaluados no presentaron síntomas gastrointestinales (Fig. 3).



**Fig. 3.** Porcentaje de los síntomas presentes en los niños infectados con *Entamoeba histolytica*, provenientes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.



#### IV. DISCUSIÓN

En el Perú la amebiasis intestinal se ha reportado con mayor frecuencia en las regiones de Junín (53%), Cuzco (38,6%), Arequipa (30%) y Puno (16%)<sup>10</sup>. Sin embargo, la Dirección Regional de Salud Piura (2013) reporta un total de 2090 casos de amebiasis intestinal, siendo los lugares con mayor prevalencia: Sullana 10,1% (211/2090), Ignacio Escudero 9,1% (190/2090) y Piura 6,69% (140/2090)<sup>37</sup>. En la presente investigación, se determinó que el 12,5% (10/80) de las muestras fecales fueron positivas a *Entamoeba histolytica* por medio del examen directo (Ver Anexos, Tabla 4). Sin embargo, con la técnica de ELISA se obtuvo el 15% (12/80) de muestras positivas a *Entamoeba histolytica*, confirmandose así la necesidad de usar técnicas inmunológicas que permitan un mejor diagnóstico de laboratorio.

La técnica más utilizada es el examen directo con solución salina fisiológica (SSF) al 0.85% y lugol, donde las muestras de heces son recolectadas en envases plásticos y analizadas en un lapso no mayor de una hora. Se realiza el examen macroscópico para obtener las características físicas de las muestras y microscópico para evidenciar el complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*<sup>33</sup>. En el laboratorio del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura, sólo realizan el diagnóstico parasitológico por medio del examen directo y tal como se muestra en la fig. 14 del 12,5% (12/80) de las muestras positivas a *Entamoeba histolytica*, el 8,75% (7/80) estuvieron acompañadas de otros protozoarios y helmintos siendo estos fácilmente identificados por medio de esta técnica. Sin embargo, con este procedimiento son frecuentes los reportes de falsos positivos al observar *Entamoeba coli* o macrófagos que han fagocitado hematíes y confundirlos con *Entamoeba histolytica*.

Se considera importante que en los laboratorios clínicos se apliquen técnicas específicas que ayuden a identificar a la especie patógena. Si bien, las técnicas moleculares requieren de equipos y reactivos costosos, además de un personal entrenado, las técnicas serológicas como por ejemplo el ELISA, orientadas a la identificación de antígenos directo en la muestra fecal son de fácil ensayo, rapidez y a la vez ofrece la detección de una infección aguda<sup>15</sup>. Independientemente del resultado coproparasitológico, todas las 80 muestras fecales evaluadas, fueron sometidas a la técnica de ELISA. De las cuales el

15% fueron positivas a la técnica y solo 7 correspondieron a las observadas al examen directo (Ver Anexos, Fig. 16).

Adicionalmente, mediante la técnica de ELISA se detectó que el 85% (68/80) de las muestras estudiadas fueron negativas a la técnica (Tabla 1). Para Chacín-Bonilla (2010), estos resultados podrían indicar la presencia de reactividad cruzada, ya que los niños evaluados en este estudio estuvieron infectados con otros enteropatógenos<sup>21</sup>.

La mayoría de las pruebas serológicas están basadas en la detección de la respuesta específica de anticuerpos ante la presencia del parásito. Sin embargo, esto se transforma en un problema cuando se debe determinar si el cuadro es agudo o crónico, debido a la persistencia de niveles elevados de anticuerpos desde meses hasta años luego de la infección. Por lo tanto la detección de antígenos ya sea en sangre, orina o heces fecales aporta un marcador más apropiado para determinar la presencia de una infección activa<sup>7</sup>. En efecto, el empleo del inmunoensayo enzimático evidenció la presencia del antígeno específico de *Entamoeba histolytica* en 12, de los 80 muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura. La interpretación de estos resultados obtenidos por la técnica ELISA fue cualitativa, mediante la visualización de color al ser comparado con el control positivo, el color amarillo de mayor o igual intensidad del control positivo determinó la reacción indicando la detección del antígeno de *Entamoeba histolytica* (Ver Anexos, Fig. 12).

Al respecto, estudios realizados en una población rural de Cundinamarca (Colombia) reportan 10,5% (11/104) de las muestras positivas a *Entamoeba histolytica* por la técnica de ELISA (TechLab kit)<sup>8</sup>. De igual manera, en una población urbana de Lima (Callao) reportan el 19,13% de las muestras positivas a *E. histolytica* utilizando la prueba de ELISA *E. histolytica* (TechLab, Blacksburg, Va.)<sup>35</sup>. En el presente estudio, se encontró que el 15% (12/80) de las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura fueron positivas a *Entamoeba histolytica* por la técnica de ELISA, empleando el test RIDASCREEN®- *Entamoeba*.

Se encontró que en 88 muestras analizadas, las heces de los pacientes en los que el examen microscópico fue positivo fueron examinados macroscópicamente y el 50% (9)

contenían sangre, el 50% (9) contenían sangre y moco, y el 100% (18) contenían moco. Estas tasas fueron 30% (21), 27% (19), y 78,5% (55), respectivamente, en pacientes en los que el examen microscópico fue negativo. De los pacientes cuyos fecal antígeno con ELISA fue positivo, el 30,7% (8) tenía sangre en heces, el 30,7% (8) tenía sangre y moco, y el 69,2% (18) tenían moco. Estas tasas fueron 24% (15), 24% (15), y 74% (46), respectivamente, en pacientes cuya fecal antígeno con ELISA fue negativo<sup>36</sup>. En anexos, tabla 3, los resultados nos muestran que en el examen microscópico fueron positivas 10 muestras correspondiente al 12,5% y en el examen macroscópico el 1,25% (1/80) de muestras contenían sangre, el 7,5% (6/80) moco y sangre y el 3,75% (3/80) moco. Asimismo se obtuvieron 12 muestras positivas con la técnica de ELISA (Tabla 1), los resultados que fueron negativos en esta técnica presentaron las siguientes características macroscópicas: 3,75% (3/80) de presencia de sangre y moco, 42,5% (34/80) de moco y el 38,75% (31/80) que no presentó ninguna de las características antes mencionadas. Las muestras positivas presentaron las siguientes características: 7,5% (6/80) de presencia de sangre y moco, 6,25% (5/80) de moco y el 1,25% (1/80) que no presentó ninguna de las características. Presentando una semejanza con la investigación citada anteriormente.

De igual manera, afirman que los eritrocitos estaban presentes en el examen directo microscópico de las heces en el 61% (11) de los pacientes cuyo examen microscópico fue positivo y en el 44,2% (31) de los casos cuyo examen microscópico fue negativo<sup>36</sup>. En el laboratorio del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura reportaron mediante el examen directo que el 8,75% (7/80) de las muestras positivas contenían eritrocitos y que el 3,75% (3/80) de las muestras negativas también presentaban eritrocitos, lo cual no coincidió con los resultados obtenidos por los autores antes mencionados. La ausencia de este signo (presencia de eritrocitos) no significa que el patógeno no esté presente, pues la aparición de ésta va a depender de la respuesta inmune del individuo, virulencia del parásito y la fase en que se encuentre la enfermedad<sup>19</sup>.

La amebiasis intestinal aguda es un problema serio en niños. Los signos y síntomas son variables y consisten en diarrea simple, con 4 a 5 evacuaciones en 24 horas, diarrea con moco, diarrea con sangre, diarrea con moco y sangre o síndrome disentérico; también dolor abdominal en flanco y fosa iliaca derecha, pujo y tenesmo rectal<sup>25</sup>. En la

información recolectada sobre la clínica presentada en cada uno de los niños evaluados para el momento de la toma de muestras, se demostró que la diarrea aguda fue el síntoma más común de estas infecciones por *Entamoeba histolytica* 10% (8/80) acompañadas de síndrome febril 8,75% (7/80) y dolor abdominal 7,5% (6/80), seguido de cuadro disentérico 3,75% (3/80) (Fig. 3). Debido a la mala higiene personal, la falta de agua potable e inadecuada manipulación de alimentos; así como la mala disposición de excretas y basura, seguido por la presencia de vectores mecánicos, tales como moscas y cucarachas, entre otros.

Se denomina portador asintomático al individuo que excreta quistes de *Entamoeba histolytica* en las heces sin que presente enfermedad amebiana propiamente dicha<sup>24</sup>. Resulta de gran importancia epidemiológica este tipo de sujetos, ya que detectarlos y darles tratamiento evita el contagio a otros individuos de la comunidad<sup>20</sup>. En efecto, de los 80 niños evaluados se encontró que el 2,5% (2/80) no presentaron síntomas gastrointestinales (Ver Anexos, Fig. 15), y en 1,25% (1/80) de estos individuos se evidenció quistes de *Giardia lamblia* y *Entamoeba coli* mediante el examen directo, sin embargo con la técnica de ELISA resultó positiva a *Entamoeba histolytica* (Fig. 3).

## V. CONCLUSIONES

El 15% (12/80) de las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura fueron positivas a *Entamoeba histolytica* por la técnica de ELISA.

Se evidenció que las infecciones por *Entamoeba histolytica* ocurrieron en niños sintomáticos en un 13,75% (11/80) y asintomáticos en 1,25% (1/80), siendo la diarrea el síntoma más frecuente con un 10% (8/80).

## VI. RECOMENDACIONES

Solicitar a las autoridades correspondientes, los recursos necesarios para la aplicación de técnicas precisas que permita la identificación correcta de especies con alta sensibilidad, lo que contribuirá a un mejor manejo terapéutico de infecciones e incrementará el conocimiento en la biología, diagnóstico y epidemiología de la especie en estudio.

Unificar el criterio en cuanto a reporte propuesto por la OMS, en todos los laboratorios clínicos, cuando no se distinga la especie patógena de otras amibas u otras células.

Realizar investigaciones en las zonas rurales de nuestra región, para determinar la prevalencia de la infección por *Entamoeba histolytica*, pues la circulación del parásito está aumentando en nuestro medio debido a los altos índices de contaminación.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tanyuksel M y Petri W. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev 2003; 16:713-729.
2. Rodríguez, M. 2009. *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en individuos sintomáticos y asintomáticos por métodos convencionales y moleculares provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Tesis de pregrado. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre.
3. Stauffer W y Ravdin J. *Entamoeba histolytica*, anupdate. Curr Opin Infect 2003; 16: 479-485.
4. Haque R, Mollah N, Ali I, Eubanks A, Lysterly D y Petri W. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the techlab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. Journal Clinical Microbiology 2000; 38: 3235-3239.
5. Stanley S. Protective immunity to amebiasis: New insight and new challenges. Infection Diagnostic. 2001; 184: 504-506.
6. Haque R y Petri W. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. Arch Med Res 2006; 37: 273-276.
7. Rashidul M, Huston C, Hughes M, Houpt E y Petri M. Amebiasis. N Engl Med 2005; 16: 348.
8. Díaz A, Rivero R, Bracho M, Castellanos S, Acurero E, Carchi L y Atencio T. Prevalence of intestinal parasites in children of YukpaEthnia in Toromo, Zulia State, Venezuela. Rev. Med. Chil 2006; (134): 72-78.

9. Dimiceli L. *Entamoeba histolytica*, especies patogénica y no patogénica. Laboratorio Médico 2004; (35): 613-616.
10. Tasawar Z, Kausar S y Lashari M. Prevalence of *Entamoeba histolytica* in humans. Pak J Pharm Sci 2010; 23(3): 344-348.
11. Tuyuta H, Cermeño R y Cermeño J. Prevalencia de amebiasis extraintestinal en el estado Bolívar. Revista Sociedad Venezolana Microbiología 2002; 22: 120-132.
12. Beaver P, Jung R, Cupp E. Parasitología Clínica de Craig y Faust. 3era ed. México: Masson Editores; 2003.
13. Ali I, Hossain M, Roy S, Ayeh-Kumi P, Petri W, Haque R y Clark C. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. Emerging Infectious Diseases. [Revista on-line] 2003 [Fecha de acceso 17 agosto 2013]; 9 (580-584). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2972761/>
14. World Health Organization Amoebiasis. WHO. Weekly Epidemiol 1997b; 72: 97-100.
15. Stanley SL Jr. Amoebiasis. Lancet 2003; 361: 1025-34.
16. Blessmann J, Van A y Tannich E. Epidemiology and treatment of amebiasis in Hue, Vietnam. ArchMed Res 2006; (37): 270-272.
17. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E y Petri WA Jr. Amebiasis. N Engl J Med 2003; 348 (16): 1565-1573.
18. Haque R, Neville L, Hahn P y Petri WA Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. J Clin Microbiol 1995; 33 (10):2558-2561.



19. Bracho, A. 2007. *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*. Diagnosticadas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y su Correlación con la presencia o no de manifestaciones clínicas en la Comunidad de Santa Rosa de Agua. Tesis de pregrado. Universidad del Zulia. República Bolivariana de Venezuela.
20. González-Ruiz A, Haque R y Aguirre A. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. J Clin Pathol 1994; 47 (3): 236-239.
21. Chacín-Bonilla L. Amibiasis: Implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos. Investigación clínica 2010; 51 (2): 239-256.
22. Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S y Chavalitsheewinkoon-Petmitr P. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. J Clin Microbiol 2006; 44 (9):3196-3200.
23. Parija SC, Khairnar K. *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. J Health Pop Nutr 2005; (23): 292-5.
24. Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, et al. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. Exp Parasitol 2005; 110: 327-30.
25. Rivero Z, Bracho A, Calchi M, Díaz I, Acurero E, Maldonado A, Chourio G, Arráiz N, Corzo G. Detección y diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa en individuos de una comunidad del estado Zulia, Venezuela. Cad Saúde Pública 2009; 25:151-159.

26. Stark D, Van Hal S, Fotedar R, Butcher A, Marriott D, Ellis J, et al. Comparison of stool antigen detection kits to PCR diagnosis of amebiasis. J ClinMicrobiol 2008; 46:1678-81.
27. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Clinical Microbiology Reviews 2000; (13):318-331.
28. González Vásquez M, Carabarin Lima A, Baylon Pacheco L y Rosales Encina J. De amibas y amebiasis: *Entamoeba histolytica*. Universidad Autónoma de Puebla 2012; 19 (87): 13-18.
29. Ortiz-Ortiz L y Rosales-Borjas D. Amibiasis: Aspectos relevantes de la respuesta inmunitaria y del diagnóstico de laboratorio. Revista Médica de la Extensión Portuguesa 2007; 1 (1): 45-54.
30. Nuñez Y, Fernández M, Torres D, Silva J, Montano L, Maestre J, Fonte L. Multiplex Polymerase Chain Reaction Amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entameoba dispar* DNA from stool samples. Am. J Trop Med Hyg 2001; 64(5,6): 293-297.
31. Mora, L. 2006. Caracterización molecular y epidemiología de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en pacientes con diarrea en Cumaná, estado Sucre. Tesis de Postgrado en Biología Aplicada. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre.
32. Butcher A, Ellis J, Fotedar R, Harkness J, Marriott D, Stark D y Van Hal S. Comparison of stool antigen detection kits with PCR for the diagnosis of amebiasis. J. Clin. Microbiol 2008; (46): 368-371.
33. Haque R, Neville L, Hahn P y Petri WA Jr. Diagnosis and Differentiation of *Entamoeba* Infection in Makkah Al Mukarramah Using Microscopy and Stool Antigen Detection Kits. World Journal of Medical Sciences 2007; 2 (1): 15-20.

34. Stanley SI, Jackson TFHG, Foster L, Singh S. Longitudinal study of the antibody response to recombinant *Entamoeba histolytica* antigens in patients with amebic liver abscess. Am J Trop Med Hyg 1998; 58:414-416.
35. Cornejo W, Espinoza Y, Huiza A, Alva P, Suarez R, Sevilla C, Naquira C. Prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* por ELISA en muestras fecales de una población urbana de Lima. An. Fac. Med 1999; (60): 1-5.
36. Ramírez A; Brito I. y Ávila C. Diferenciación de *Entamoeba histolytica* /*Entamoeba dispar* en pacientes con diagnóstico parasitológico de *Entamoeba histolytica*. Biomédica 2008; (21): 167-171.
37. Sandoval C. Dirección Regional de Salud Piura. [Revista on-line] 2014 [Fecha de acceso 20 de febrero del 2014]; 2(104).Disponible en: <http://www.diresapiura.gob.pe/drsp/misionvision.html>.

# ANEXOS

Tabla 2. Datos personales y diagnóstico coproparasitológico de los pacientes procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

### DATOS PERSONALES Y DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO

PACIENTE: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_ N°: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Meses: \_\_\_\_\_ Años: \_\_\_\_\_

Sexo: Masculino ☐ Femenino ☐

Procedencia: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Servicio: \_\_\_\_\_

#### 1. Síntomas Clínicos:

Diarrea aguda \_\_\_\_\_ Fiebre \_\_\_\_\_ Dolor Abdominal \_\_\_\_\_  
Disentería \_\_\_\_\_ Asintomáticos \_\_\_\_\_ Otros \_\_\_\_\_

#### 2. Características Macroscópicas de las Heces:

Consistencia: \_\_\_\_\_ Color: \_\_\_\_\_  
Sangre: \_\_\_\_\_ Moco: \_\_\_\_\_

#### Resultado de la Investigación:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3. Diagnóstico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Responsable

Tabla 3. Características macroscópicas de las muestras fecales positivas y negativas a *Entamoeba histolytica* por examen directo, procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

Características de las Muestras Fecales		Examen Microscópico			
		Muestras Positivas		Muestras Negativas	
		Nº	%	Nº	%
Consistencia	Diarreica Líquida	7	8,75	30	37,5
	Diarreica	2	2,5	31	38,75
	Acuosa	0	0	1	1,25
	Líquida	1	1,25	5	6,25
	Semilíquida	0	0	3	3,75
Presencia	Moco	3	3,75	36	45
	Sangre	1	1,25	0	0
	Sangre y Moco	6	7,5	3	3,75
Ausencia de sangre y moco		0	0	31	38,75

Tabla 4. Especies parasitarias identificadas por examen directo en las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

Especies Parasitarias	Nº	Prevalencia %
<b>Protozoarios</b>		
<i>Giardia lamblia</i>	62	77,5
<i>Entamoeba coli</i>	30	37,5
<i>Entamoeba histolytica</i>	10	12,5
<i>Blastocystis hominis</i>	9	11,25
<b>Helmintos</b>		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	8	10
<i>Hymenolepis sp</i>	5	6,25
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	1,25

Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en la primera corrida de las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.064	0.044 NEG	1.497 POS	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
B	0.058	0.045 NEG	0.048 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
C	1.395	0.046 NEG	0.045 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
D	1.400	0.042 NEG	0.046 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
E	0.050 NEG	0.047 NEG	0.043 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
F	0.048 NEG	0.048 NEG	1.510 POS	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
G	0.054 NEG	0.049 NEG	0.041 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
H	1.499 POS	0.044 NEG	0.042 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG

❖ Cálculo de Cut-off o Punto de Corte =  $\frac{0.064 + 0.058 + 0.15}{2} = 0.211$



Tabla 6. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en la segunda corrida de las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.057	1.548 POS	0.073N EG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
B	0.049	0.049 NEG	1.560P OS	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
C	1.388	0.052 NEG	0.054 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
D	1.478	0.051 NEG	0.065 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
E	0.050 NEG	0.061 NEG	0.063 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
F	0.059 NEG	1.547 POS	0.048 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
G	0.067 NEG	0.053 NEG	0.086 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
H	1.530 POS	0.050 NEG	1.520 POS	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG

❖ Cálculo de Cut-off o Punto de Corte =  $\frac{0.057 + 0.049 + 0.15}{2} = 0.203$

Tabla 7. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en la tercera corrida de las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.053	0.048 NEG	1.647 POS	0.052 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
B	0.050	0.047 NEG	0.055N EG	0.048 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
C	1.625	0.051 NEG	0.043 NEG	0.051 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
D	1.490	0.047 NEG	0.046 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
E	0.087 NEG	0.060 NEG	1.642 POS	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
F	0.055 NEG	0.049 NEG	0.045 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
G	0.058 NEG	0.059 NEG	0.055 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
H	1.631 POS	0.051 NEG	0.047 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG

❖ Cálculo de Cut-off o Punto de Corte =  $\frac{0.053 + 0.050 + 0.15}{2} = 0.2015$

Tabla 8. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en la cuarta corrida de las muestras fécales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.054	0.054 NEG	1.787 POS	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
B	0.050	0.052 NEG	0.052 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
C	1.835	0.064 NEG	0.047 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
D	1.580	0.043 NEG	0.045 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
E	0.057 NEG	0.049 NEG	0.048 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
F	0.053 NEG	0.044 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
G	0.055 NEG	0.050 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG
H	0.050 NEG	0.052 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG	< 0.001 NEG

❖ Cálculo de Cut-off o Punto de Corte =  $\frac{0.054 + 0.050 + 0.15}{2} = 0.202$



Fig.4. Reactivos y materiales utilizados para la identificación de *Entamoeba histolytica* por la técnica de ELISA.



Fig.5. Equipo semiautomatizado de ELISA marca Tecam: A la izquierda, el lavador de placas y a la derecha el fotómetro lector de microplacas



Fig. 6. Conservación de las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

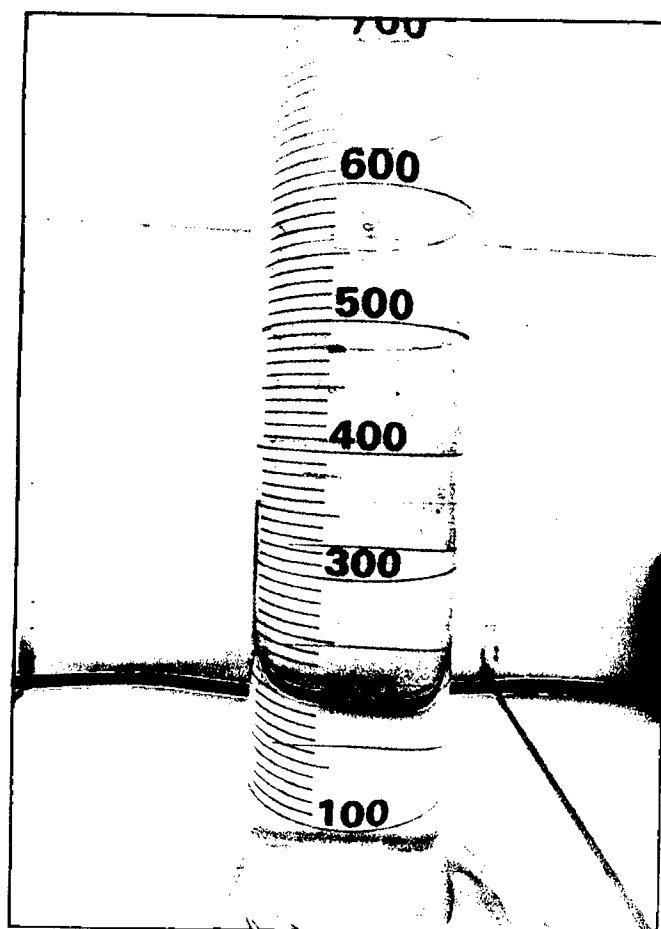


Fig. 7. Preparación del buffer de lavado.

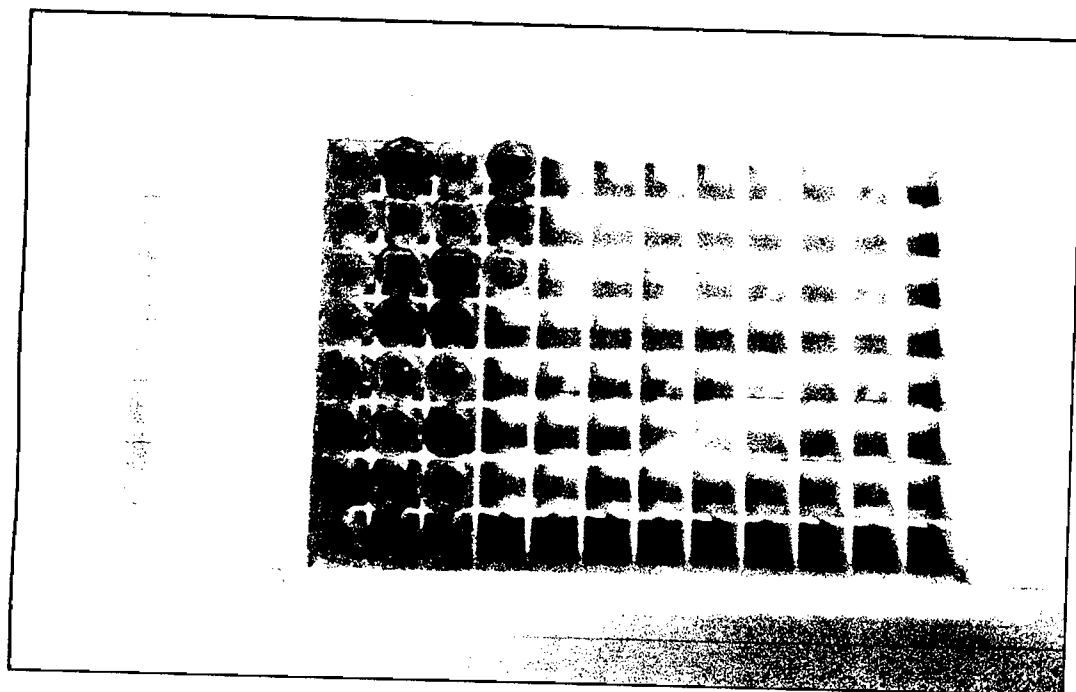


Fig. 8. Primera incubación de las muestras.

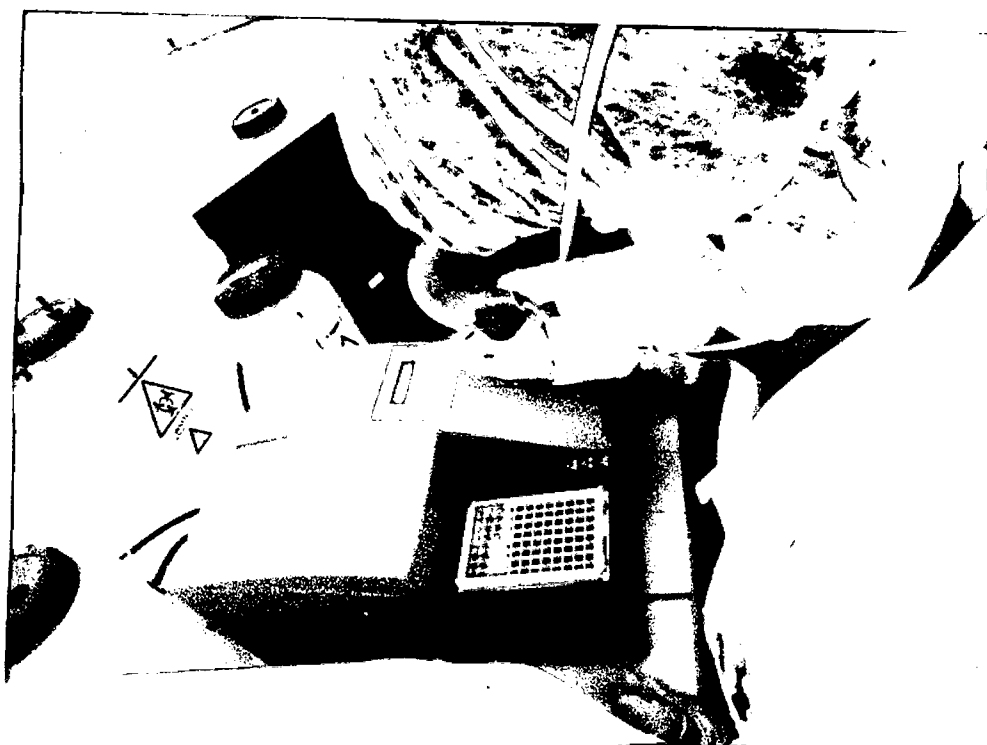


Fig. 9. Lavado de las muestras.

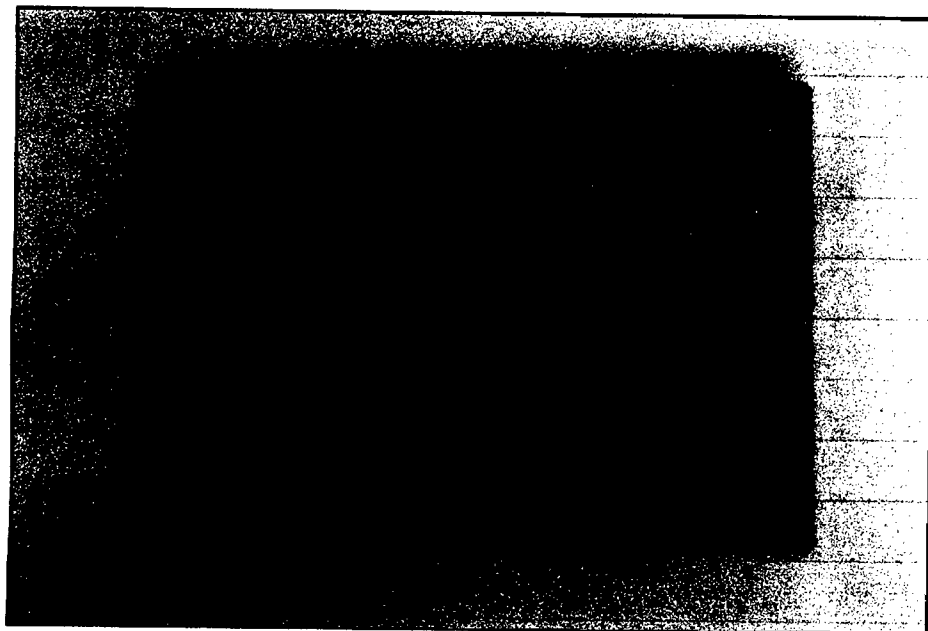


Fig. 10. Segunda incubación de las muestras en la oscuridad.



Fig. 11. Evaluación fotométrica a 450 nm.

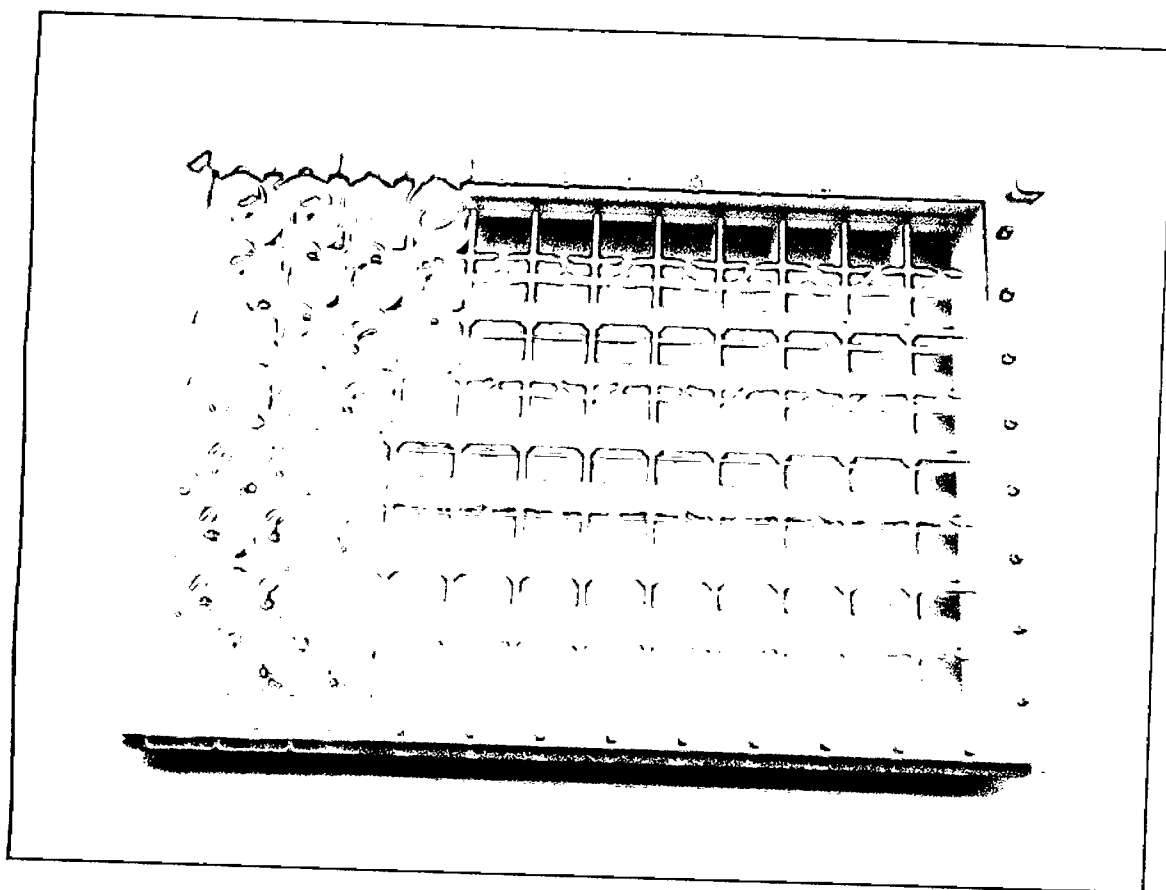


Fig. 12. Muestras positivas a *Entamoeba histolytica* por la técnica de ELISA.

Leyenda: Controles Negativos: A1, B1; Controles Positivos: C1, D1; Pocillos Positivos H1, 3A, 3E

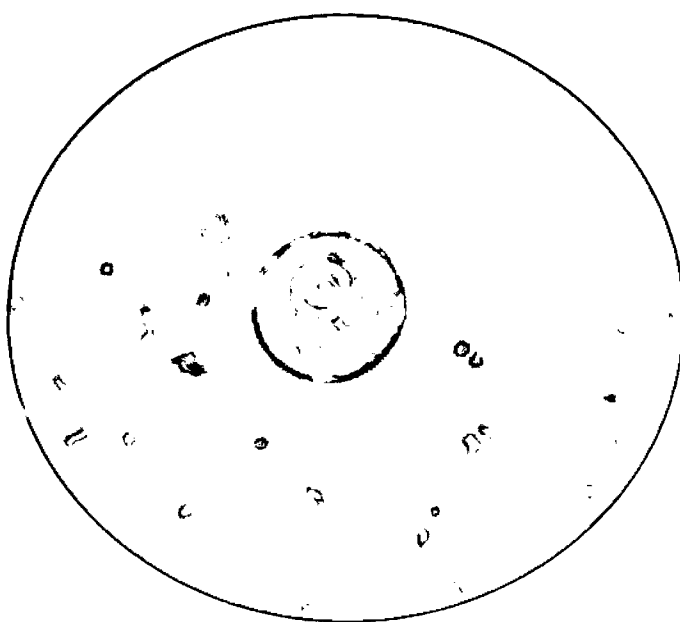


Fig. 13. Quiste de *Entamoeba histolytica*. Montaje en fresco 100x



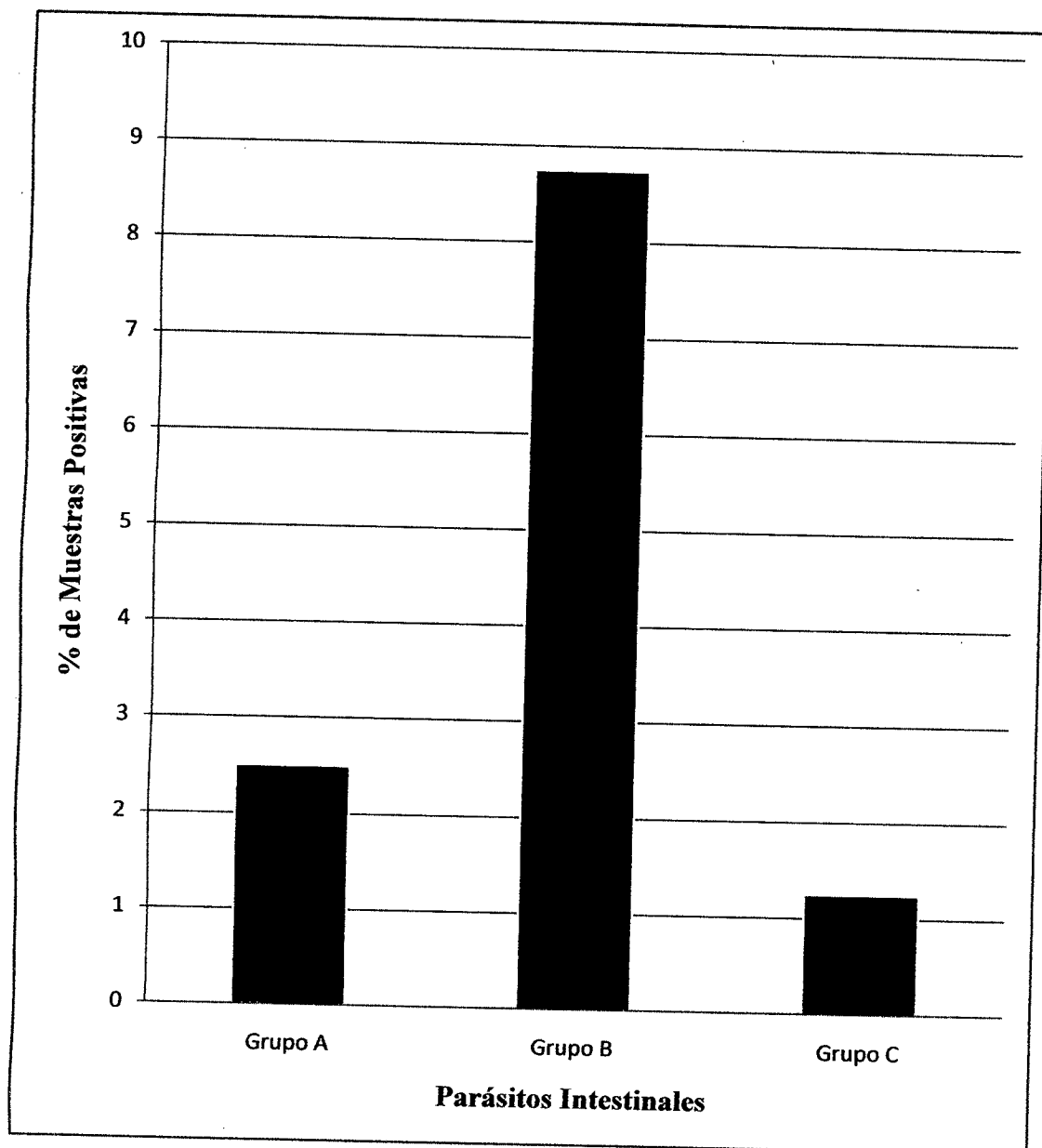


Fig.14. Porcentaje de muestras positivas a *Entamoeba histolytica* asociados a otros protozoarios y helmintos intestinales en las muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

Leyenda: Grupo A: *E.histolytica*; Grupo B: *E. histolytica*, *G.lamblia*, *A.lumbricoides* y *B.hominis*; Grupo C: *E. histolytica* y *E. coli*.

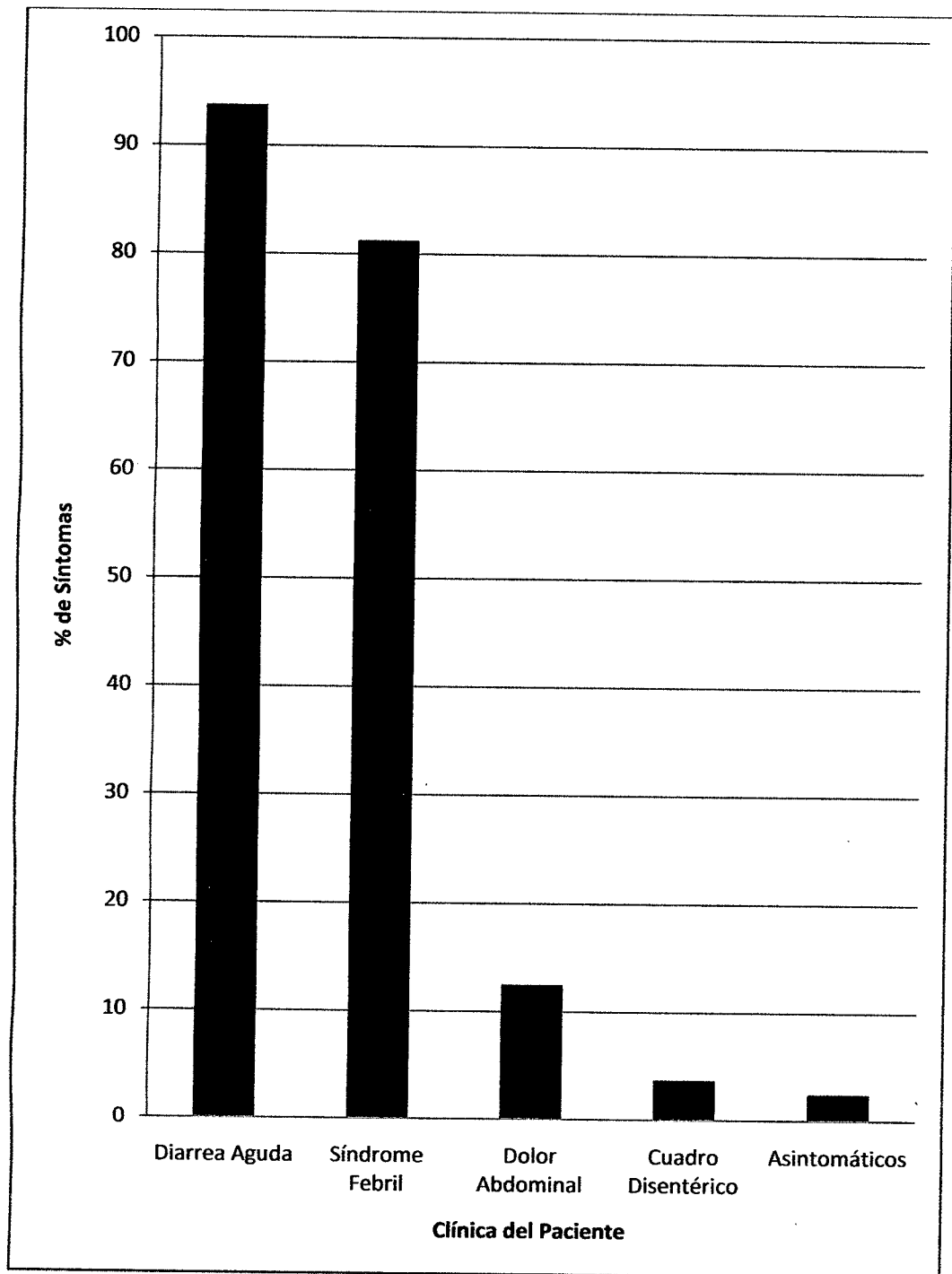


Fig. 15. Porcentaje de los síntomas presentes en los niños infectados con enteroparásitos, provenientes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.

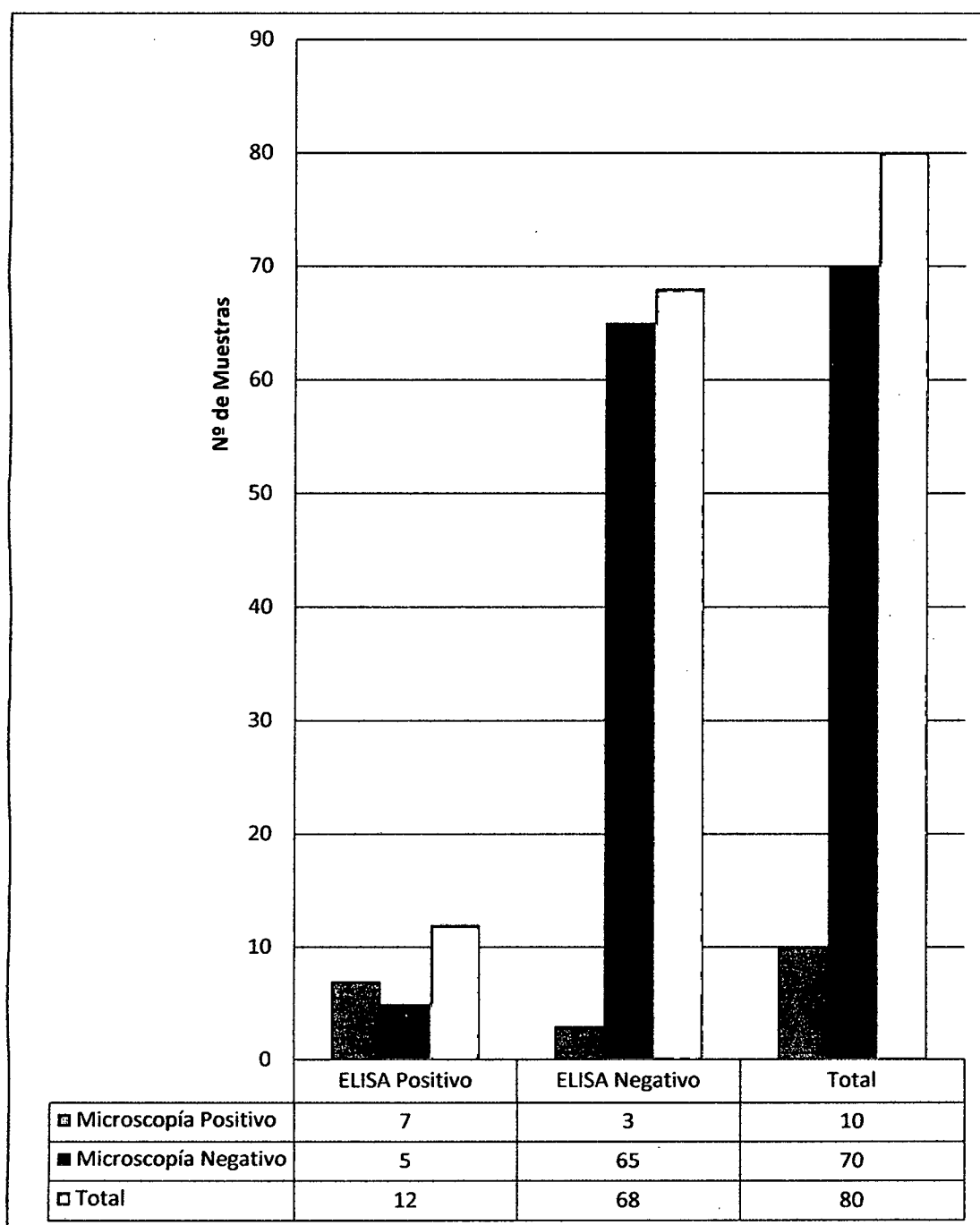


Fig. 16. Resultados de microscopía y ELISA en muestras fecales procedentes del anexo pediátrico del Hospital de Apoyo II Santa Rosa-Piura.